

(5) 試験薬との因果関係（4分類）

①明らかに関連あり

時間的に明白な相関関係（投与中止後の経過を含む）があり、かつ下記のいずれかに該当する場合

- ・偶然の再投与により、同様の所見を認める場合
- ・薬剤感受性試験（皮膚テストなど）陽性の場合
- ・体液、血液内濃度測定により中毒量であることが認められる場合

②多分関連あり

時間的に明白な相関関係（投与中止後の経過を含む）があり、かつ原疾患、合併症、併用薬、併用処置等当該試験薬以外の要因がほぼ除外される場合

③関連があるかもしれない

時間的に明白な相関関係（投与中止後の経過を含む）があり、かつ原疾患、合併症、併用薬、併用処置等他の要因も推定されるが、当該試験薬による可能性も除外できない場合

④関連なし

時間的に相関関係がないと考えられる場合。原疾患、合併症、併用薬、併用処置など他の要因によると考えられる場合

8.5 症例報告書への記載事項

試験期間中に新たな有害事象が発生した場合には、症例報告書の有害事象記入欄にその内容、程度、発生日、処置（試験薬の中止・継続・投与終了・休薬および有害事象に対する治療内容）、転帰（回復・軽快・未回復・回復したが後遺症あり・死亡・不明）、転帰日を記入するとともに、試験との因果関係を前項の「有害事象の評価方法および基準」により判定する。

9. 試験の安全性の確保

9.1 研究協力者の安全を確保するための事項

担当医師は、研究協力者が試験参加中、必要かつ適切な観察・検査を行い、研究協力者の安全確保に留意する。

有害事象の発現に際しては必要に応じて適切な処置を施し、研究協力者の安全性の確保に留意し、その原因究明に努める。試験の継続が難しい場合は試験終了とするが、原則として追跡調査を実施する。

9.2 有害事象等が発現した時の処置

- (1) 有害事象の発現に際しては必要に応じて適切な処置を施し、研究協力者の安全性の確保に留意し、その原因究明に努める。
- (2) 研究協力者の試験参加中およびその後を通じ、試験に関連した臨床上問題となる重篤な有害事象に対して十分な医療措置を行う。
- (3) 重篤な有害事象が認められた場合には試験薬との関連性の有無に関わらず、速やかに研究事務局を通じて安全モニタリング委員会に報告する。
安全モニタリング委員会は有害事象の評価に基づき、試験の妥当性を検討し、継続が適当でないと判断した場合は早期終了を勧告することができる。
- (4) 重篤な有害事象が発生していない場合でも最低1年に1回安全モニタリング委員会に状況を報告し、安全性を確認する。

10. 試験薬の投与についての中止基準およびその手順

以下の場合には投薬を中止する。

- ・投与中止を要する有害事象の発生が疑われた場合
- ・研究協力者が協力の中止を希望した場合

11. 来院しなかった研究協力者への対応

外来来院予定日に受診しなかった研究協力者には電話にて連絡をとり、体調面での異常の有無を確認し、来院を促す。

12. 試験実施期間

2013年5月～2013年11月

(登録期間：2013年5月～2013年8月)

13. 倫理的配慮

13.1 遵守すべき諸規則

- ・臨床試験の倫理指針（厚生労働省）
- ・World Medical Association 倫理ガイドライン(Declaration of Helsinki, 1964 and Declaration of Tokyo 1975, revised 1983)

13.2 同意取得に関する事項

研究協力者には試験の目的、方法などを口頭および文書で説明し、書面にて研究への参加の同意を得る。

13.2.1 説明用文書・同意書の作成

研究責任者が作成し、大学倫理委員会が承認する。

13.2.2 同意取得の時期と方法

研究協力者の同意を得るに際し、対象となる研究協力者に対し、研究協力者が研究に参加する前に、研究責任者が作成し、大学倫理委員会で承認を得た説明文書と同意書を用いて試験の目的、方法などについて説明する。また、研究協力者が内容を十分に理解できたか確認した上で本研究への参加について研究協力者の自由意志による同意を文書により取得する。

13.2.3 説明内容

- (1) 研究目的
- (2) 研究協力の任意性と撤回の自由
- (3) 研究方法・協力事項
- (4) 研究協力者にもたらされる利益および不利益
- (5) 個人情報の保護
- (6) 研究計画等の開示
- (7) 協力者への結果の開示
- (8) 研究成果の公表
- (9) 研究から生じる知的財産権の帰属
- (10) 研究終了後の試料取り扱いの方針
- (11) 費用負担に関する事項
- (12) 問い合わせ先
- (13) 健康被害に対する補償について

13.3 個人情報の保護

研究協力者のプライバシーの保護について下記事項を遵守する。

- (1) 研究協力者の特定は識別コードを用いて行う。
- (2) 患者検体、データなどの取り扱いにおいては十分注意し、研究協力者のプライバシーを保護する。

患者検体は測定が終了時点でカルテ番号を消去し破棄する。個人情報管理者は新たに管理 ID を設定し、カルテ番号との連結表を作成し、データなどは全て管理 ID で厳重に管理する。(連結可能匿名化)

また、本研究に関する一切の試料など(検体、データ)は当院内で保管し、国立循環器病研究センターには移動されない。

14. 研究費用

14.1 資金源

本研究の資金は厚生労働省の科学研究費から支給される。

14.2 本研究の治療に関する費用

外来診察費用、通常の薬剤費用、入院費用は他の慢性腎臓病患者と同様に保険診療下で行われ、自費負担分の費用は通常通り患者負担となる。本研究で行われる特殊検査項目や投与ペプチド（グレリン）の費用は患者負担とはならず、厚生労働省の科学研究費から支払われる。

15. 健康被害に対する補償

本研究では臨床研究に関する倫理指針の規定により被験者に生じた健康被害の補償のための保険に加入し、万一被験者に健康被害が生じた場合補償する。

16. 研究結果の公表に関する取り決め

本試験で得られた成績を適切な学会・医学雑誌に公表することができる。その際には研究協力者の個人情報は一切公表されない。

17. 試験実施計画書の承認および改訂

プロトコルの承認、改訂は本試験の中央委員会および大学倫理委員会の承認を経て研究責任者が改訂する。

18. 研究の終了

全患者がプロトコルを終了した時点で研究の終了とする。ただし、安全モニタリング委員会は重大な有害事象の発生などの理由で研究の早期終了を指示することができる。その際は本試験の中央委員会への連絡を経て研究責任者が実施する。

19. 研究組織

【研究責任者】

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 伊藤 裕

【実施責任者】

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 脇野 修

【中央委員会】

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 伊藤 裕 (委員長)

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 脇野 修

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 中谷 英章

【個人情報管理者】

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科・
クリニカルリサーチセンター

丸山 達也

【共同研究者】

国立循環器病研究センター研究所

寒川 賢治

【安全モニタリング委員会】

慶應義塾大学保健管理センター

河辺 博史 (委員長)

京都大学大学院医学研究科内分泌・代謝内科

向山 政志

【研究事務局】

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科

東京都新宿区信濃町 35

TEL: 03-3-5363-3796 FAX: 03-3359-2745

責任者: 脇野 修

担当者: 中谷 英章

20. 引用文献

1. Akamizu T, Takaya K, Irako T, Hosoda H, Teramukai S, Matsuyama A, Tada H, Miura K, Shimizu A, Fukushima M, Yokode M, Tanaka K, Kangawa K : Pharmacokinetics, safety, and endocrine and appetite effects of ghrelin administration in young healthy subjects. *Euro J Endocrinol* 2004; 150: 447-455
2. Damien R. Ashby, Heather E. Ford, Katie J. Wynne, Alison M. Wren, Kevin G. Murphy, Mark Busbridge, Edina A. Brown, David H. Taube, Mohammad A. Ghatei, Frederick W.K. Tam, Stephen R. Bloom, Peter Choi: Sustained appetite improvement in malnourished dialysis patients by daily ghrelin treatment. *Kidney International* 2009; 76: 199-206
2. Miyashita K, Itoh H, Tsujimoto H, Tamura N, Fukunaga Y, Sone M, Yamahara K, Taura D, Inuzuka M, Sonoyama T, Nakao K: Natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascades promote muscle mitochondrial

- biogenesis and prevent obesity. *Diabetes* 2009; 58:2880-2892
3. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K: Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660
 4. Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, Yamagishi M, Hosoda H, Oya H, Hayashi Y, Kangawa K: Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280: R1483-R1487
 5. Date Y, Nakazato M, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S: Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280: 904-907
 6. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S: A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001;409:194-198
 7. Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR: The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 2000; 141: 4325-4328
 8. Nagaya N, Itoh T, Murakami S, Oya H, Iwase T, Uematsu M, Yokota S, Maekura R, Yamagishi M, Miyatake K, Kangawa K: Treatment of cachexia with ghrelin in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Chest* 2005; 128: 1187-1193
 9. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K: Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4753-4758

II. 平成26年度分担研究報告

グレリン受容体欠損マウスを用いた グレリンの腎保護作用に関する研究

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 徳山 博文

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 脇野 修

[目的] GH 放出促進因子受容体 (GHSR) の内因性リガンドである Ghrelin (Ghr) の抗酸化作用による腎障害抑制効果を報告した。今回内因性の Ghr の腎保護作用を検討する目的で GHSR 欠損マウスにおける腎障害を検証した。[方法] Ghr 受容体欠損(GHSR null)マウス (Zigman 教授より供与) の腎臓の表現型の解析を行った。また近位尿細管特異的な Cre マウスである NDRG Cre マウス (京都大学柳田教授より供与) との交配によりタモキシフェン (Tam) 誘導的に近位尿細管に GHSR が回復するマウスを作成し表現型を解析した。[結果] GHSR null マウスでは既に尿蛋白増加、尿細管障害増悪を認め、腎臓の SA β -gal 染色等の老化変化や 4HNE 染色における酸化ストレス上昇の増悪を認めた。電顕では GHSR null マウスでは近位尿細管ミトコンドリアの伸長が認められた。NDRG Cre マウスとの交配により Tam 非投与群と比較し Tam 投与群が有意に近位尿細管における酸化ストレスの低下、尿蛋白と尿中 NAG の減少が認められた。GHSR null マウスの腎機能障害の改善は認められなかった。[結論]内因性の Ghr/GHSR が腎老化に関与し、近位尿細管における酸化ストレスレベルの調節において重要であることが示唆された。

A. 研究目的

グレリンとはラットとヒトの胃で発見されたペプチドホルモンで、GH 分泌促進受容体を介して GH 分泌を誘起させるホルモンである。グレリンは摂食行動の生理的信号物質であり、成長ホルモンの分泌と摂食を増進して成長を制御する。従ってその分泌は栄養状態やエネルギーバランスの変化に依存して生じる。グレリンは胃及び脳内の視床下部弓状核のニューロンで産生され、またグ

レリン受容体は脳のさまざまな部位で発現している。その一方でグレリン、グレリン受容体は腎臓にも発現が認められているが腎臓での働きについては不明な点が多い。一方慢性腎臓病でグレリンの血中レベルは上昇すると報告されており、原因として腎臓からの clearance の低下、CKD での低栄養状態に対する反応、腎臓における分解の低下、胃以外の臓器での産生の亢進などがその機序として想定されている。グレリンの腎での作用

についてはマウスの虚血再還流傷害急性腎不全において腎機能を向上させることが報告されており、我々は新規代謝調節ホルモン、グレリンの慢性腎障害に対する腎保護作用についてグレリン受容体欠損マウスおよび近位尿細管特異的のグレリン受容体が回復するマウスを用い検討し、近位尿細管における内因性グレリン・グレリン受容体経路の重要性について検討した。

B. 研究方法

内因性 Ghrelin の AII 依存性腎障害抑制効果について Growth Hormone secretagogue receptor ノックアウトマウスを用いて検討した。この GHSR^{null} は transcriptional blocking cassette (TBC) の両端に loxP があり、これらにより下流の GHSR 遺伝子の転写をブロックしているため、GHSR 遺伝子欠損マウスとなる。さらに、腎近位尿細管特異的 Ghrelin レセプター発現マウスを用いた検討を行いました。Flox⁻GHSR1 (Ghrelin receptor) null マウスに NDRG1 (n-myc downstream regulated gene 1) Cre マウスを交配させると transcriptional blocking cassette (TBC) の両端の loxP が外れ、これらにより下流の GHSR 遺伝子が転写をされる。よって、近位尿細管のみ GHSR が発現するマウスが作成出来、近位尿細管特異的な Ghrelin の作用を検討が可能となる。

C. 研究結果

まず GHSR のレセプターの免疫染色を行ったところ、GHSR ノックアウト NDRGCre マウスでは近位尿細管の GHSR 発現を確認した(図 1)。次に 20 週の GHSR と GHSR ノックアウト NDRGCre マウスの表現型を比較したが収縮期血圧と体重には変化は

なかった(図 2、図 3)。次に生化学所見では血清 BUN と Cr は GHSR ノックアウトマウスと GHSR ノックアウト NDRGCre マウスの両者に有意差はなかった(図 4、図 5)。尿蛋白と尿細管マーカーである NAG は GHSR ノックアウトマウスと比較し GHSR ノックアウト NDRGCre マウスが有意に減少していた(図 6、図 7)。さらに腎組織の所見を検討しましたところ、腎線維化は明らかな有意差を認めなかったが(図 9)、抗酸化ストレスマーカーである 4HNE 染色では近位尿細管領域を中心に GHSR ノックアウトマウスと比較し GHSR ノックアウト NDRGCre マウスが有意に酸化ストレスが低下していた(図 8)。このことより Mitochondria の多く局在する近位尿細管領域の GHSR が Ghrelin を介した抗酸化ストレス作用に重要な役割を担っていることが示唆された。

D. 考察

消化管ホルモンである Ghr は腎臓において、ミトコンドリアの UCP2 の誘導を介し AII による活性酸素レベル上昇を低下させたことが示唆された。UCP2 はミトコンドリアの inner membrane に存在し intermembrane space の H⁺ を matrix 側へ leak させる脱共役蛋白でありその結果、膜の電位勾配は低下し、活性酸素 (ROS) の産出が低下する。UCP2 はミトコンドリアにおいて O₂⁻ の産出を抑制する分子であり、細胞内の O₂⁻、ROS のほとんどはミトコンドリア由来であるから UCP2 による O₂⁻ 産出低下は極めて有効な抗酸化作用を有すると考えられた。実際、血管内皮細胞では P38MAP キナーゼを介した UCP2 の上昇により AII により誘導させた活性酸素発生を抑制し、AII 投与による血管内皮細胞の障害を抑制させたことが報告されている。我々の AII 投与による腎障害モデル

やヒト近位尿細管細胞株 (HK-2 細胞) でも UCP2 の上昇を認め、これらの代償機構を確認した。更に Ghr 投与により UCP2 の上昇が誘導され腎組織障害を抑制した。AII 投与群のマウスは NS 投与群のマウスの UCP2 よりも発現が上昇していた為 Ghr、それ自体が UCP2 発現を上昇させ、AII 投与群の UCP2 上昇とは独立して働いたものと考えられた。

AII によって誘導された ROS は病理組織学的にも腎の炎症や線維化に重要な役割を担っている。我々の AII 投与による腎障害モデルにおいても AII は NADPH オキシダーゼの腎臓での主な isoform である NOX1、NOX4 の発現を上昇させた。いままでも AII は NOX1、NOX4、p47phox、p67phox、p22phox 等の様々な NADPH オキシダーゼのサブユニットの上昇を誘導した報告がある。そして今回 Ghr は NOX1、NOX4、p22phox の発現を低下させた。すなわち Ghr の有する抗酸化作用と考えられた。また NOX の発現は還元反応によって生じていると考えられた。また今回の AII 投与による腎障害モデルで PGC1 α の発現低下とミトコンドリア数は減少していたが Ghr は強力な抗酸化作用によりこれらの低下を軽減させた。また Ghr 投与により AII 投与したマウスの血圧は低下を認めた。これは以前に分離した血管内皮細胞で血管拡張作用による直接的作用であると報告があり、これによるものと考えられた。さらに視床孤束核に Ghr を投与すると血圧低下をみとめることより交感神経に作用して血圧低下が生じた報告もある。これについては GHSR ノックアウトマウス (KO) は WT より血圧高値であったことから内因性の Ghr が血圧低下作用を呈したことも示唆された。我々の実験のモデルは AII 投与のストレスに誘導させ発症させた老化モデルである。これらの老化細胞

は炎症性サイトカインである TGF- β や PAI-1 を発現、分泌し、細胞周囲を変化させる。さらに、老化細胞は通常の細胞と比較し、易ストレス感受性になりアポトーシスを起こしやすくなる。老化関連機能障害の原因となるミトコンドリアの酸化障害もその一つである。加齢マウスの組織ではミトコンドリア数が減少し、活性酸素の蓄積やエネルギーの産生低下等の機能障害を示すことが言われている。我々の AII 投与モデルではミトコンドリア数の減少を認め、それによる ROS の産生増加や近位尿細管領域の組織障害を起こしていた。また AII type1 受容体ノックアウトマウスは WT よりも長期間生存した報告がある。また WT で加齢に伴うミトコンドリアの絶対値密度の低下は AII type1 受容体の数に依存するといわれている。我々の GHSR null (KO) マウスでも腎機能低下や同様の変化を確認している。さらに KO マウスのミトコンドリアは WT と比較し、変形伸展拡大しているミトコンドリアが多く認められた。以前に加齢ラットの心筋のミトコンドリアでも同様のことが報告されている。拡大、延長したミトコンドリアはオートファジーをさせずに蓄積されたミトコンドリアであるといわれている。このことより、KO マウスの近位尿細管領域のミトコンドリアは老化の表現型を示していることは Ghr が腎機能、腎老化を制御していることが示唆された。以前の報告で Ghr はマウスの虚血再還流傷害急性腎不全において腎機能を向上させることがいわれている。その機序として Ghr による GH/IGF-1/ PI3K/Akt の経路が活性化したことがインスリンレセプター基質 II 欠損マウスで確認された。また詳細不明であるが尿細管細胞に抗アポトーシス作用を示したことがいわれている。他の報告では Ghr 投与により前駆炎症サイトカイ

ン、特に TNF α の抑制により急性腎障害を引き起こす内毒素に対し保護的に働くこともいわれている。しかしこれらの報告では腎臓に直接影響しているか検討していない。Ghr 投与により尿中リチウムの排出を変化させずに尿中 Na の排出を増加させる。これは Ghr の遠位尿細管への直接的作用による Na 再吸収であるとさせる。我々の検討では GHSR の免疫染色で近位尿細管領域に染色性が高く、さらに近位尿細管細胞株である HK-2 細胞でも GHSR の mRNA の発現を認めている。今回 Ghr が尿細管障害を改善するか近位尿細管マーカーである尿中 NAG、NGAL を測定して検討した。さらに GHSR は近位尿細管で発現し、Ghr は腎臓で GHSR を介して腎保護効果を示すことが示唆された。また以前のでは Ghr による抗酸化効果については検討されておらず酸化ストレスは虚血再還流傷害急性腎不全において主な要因とする報告があり、Ghr の急性腎障害における腎保護効果は ROS の減少の結果起こっていると考えられた。急性腎障害と同様に酸化ストレスは慢性腎臓病の様々な研究モデルの重要な発症メカニズムと考えられている Ghrelin は Angiotensin II により誘導された酸化ストレスの上昇、老化反応、組織障害を抑制し、抗線維化作用を示しました。また Ghrelin は UCP2、PGC1 α の発現を誘導し、抗酸化作用、mitochondria の維持効果を示した。これが Ghrelin の腎障害保護作用、腎の老化反応抑制を引き起こしたと考えられました。そしてこれらの Ghrelin の作用は降圧効果非依存性であり尿細管細胞への直接効果考えられた。GHSR^{-/-} マウスは WT と比較して老化の促進、線維化の亢進、酸化ストレスの上昇、腎機能障害の増悪が認められた。GHSR^{-/-}/NDRG Cre マウスは GHSR^{-/-} マウスと比較して酸化ストレスの低下、腎機能障害の改

善を認めたことから、mitochondria の多く局在する近位尿細管が Ghrelin の腎組織保護作用に重要な役割を担っていることが示唆された。

E. 結論

Ghrelin は腎臓において、Mitochondria の UCP2 の誘導を介し活性酸素レベルを低下させました。この抗酸化作用により AngII による腎老化促進反応、線維化が抑制されたと考えられました。この抗老化抗酸化作用は内因性の Ghrelin/GHSR 経路においても認められました。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

藤村 慶子, 脇野 修, 篠塚 圭祐, 徳山 博文, 林 晃一, 伊藤 裕, 消化管ペプチド Ghrelin の腎臓における生理的意義, 第 57 回日本腎臓学会学術総会, 2014 年, 横浜. (日本腎臓学会誌, 56 : 3, 303, 2014.)

脇野 修, 藤村 慶子, 篠塚 圭祐, 徳山 博文, 林 晃一, 伊藤 裕, 消化管ホルモン Ghrelin の腎臓における作用, 第 17 回日本心血管内分泌学会, 2014 年, 横浜. (日本内分泌学会雑誌, 90 : 2, 752, 2014.)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1 GHSR の免疫染色

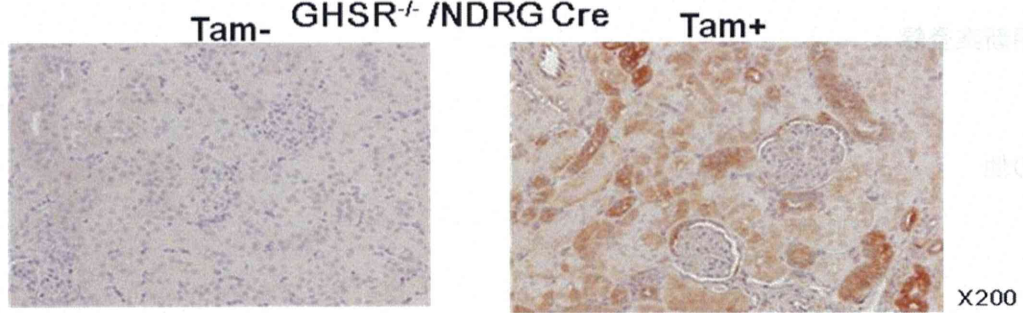


図2 収縮期血圧

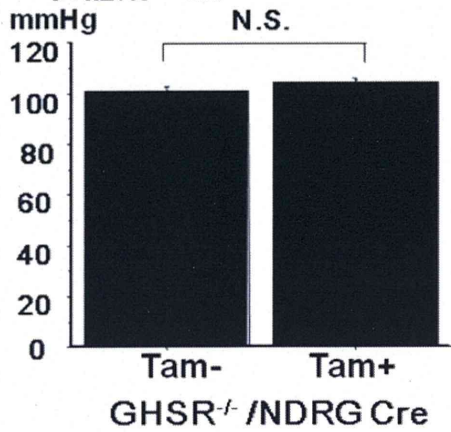


図3 体重

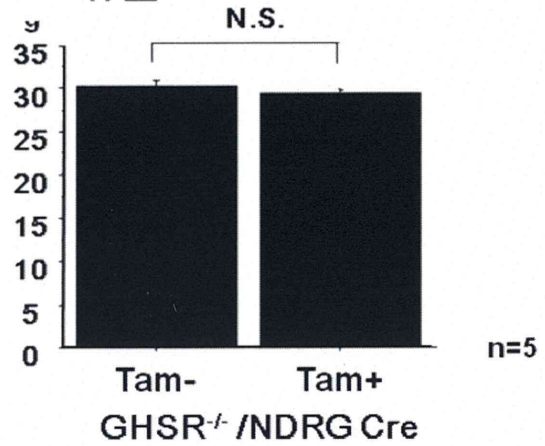


図4 血清BUN

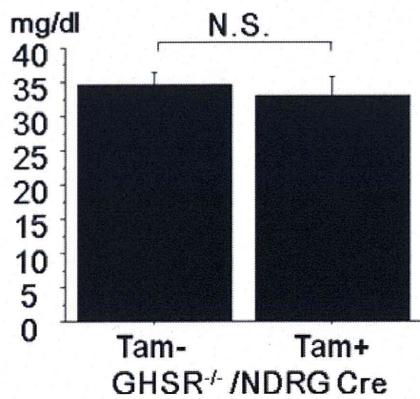


図5 血清Cr

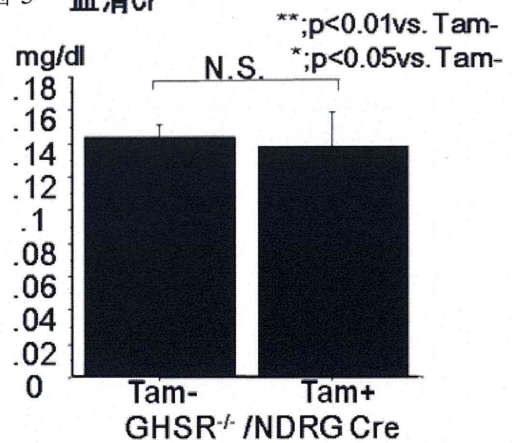


图 6

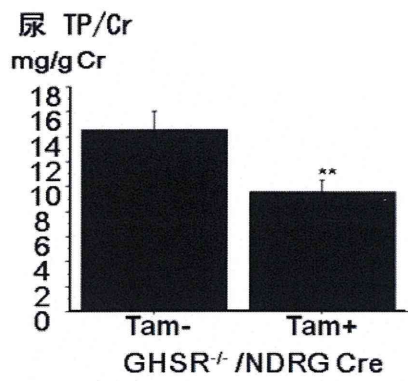


图 7

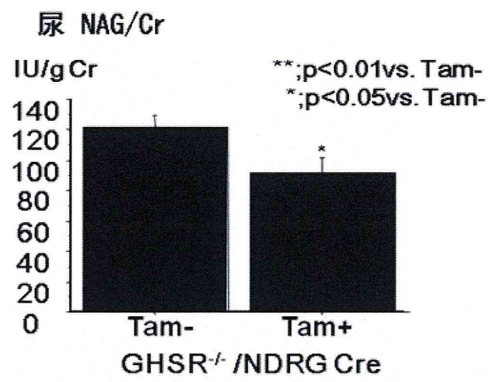


图 8

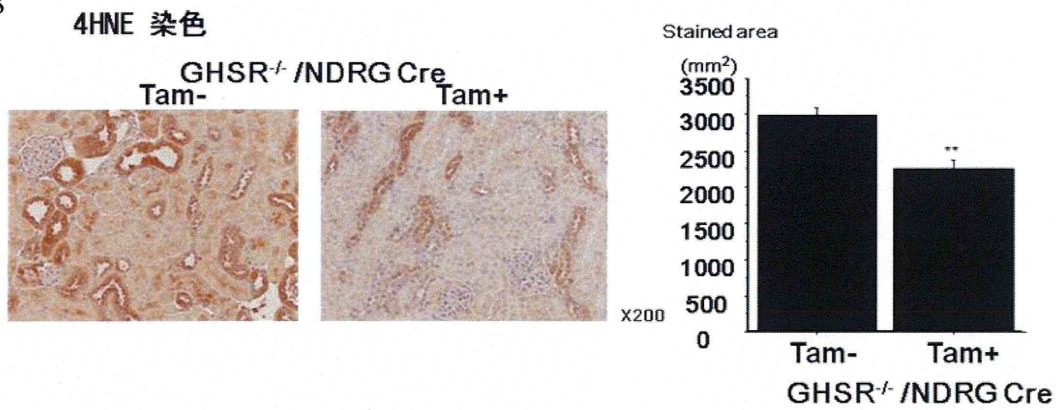
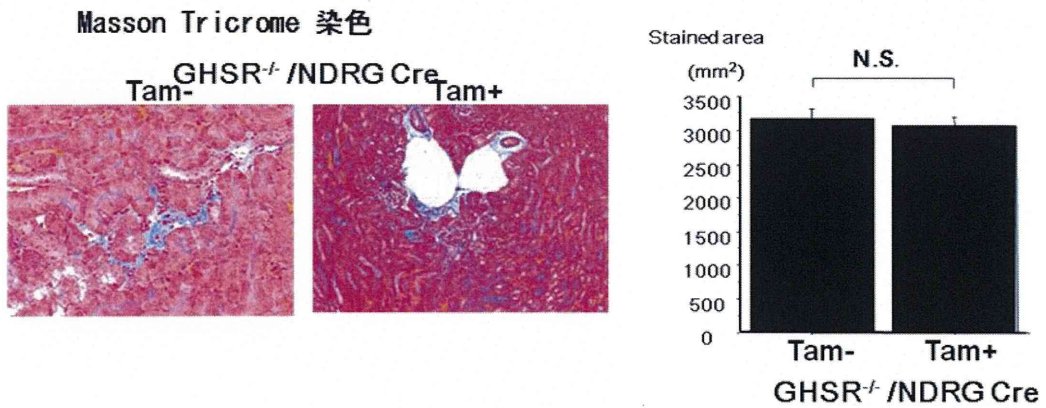


图 9



GHSR^{-/-}; GHSR-null mice

GHSR^{-/-}/NDRG Cre; GHSR-null/NDRG Cre mice
*p < 0.01 vs. Tam-

糖尿病性腎症に対するグレリン長期投与による 腎保護効果の検討

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 篠塚 圭祐

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 脇野 修

研究要旨 <背景>成長ホルモン放出促進受容体の内因性リガンドとして発見されたグレリンは成長ホルモン分泌作用、食欲増進作用のほか、抗炎症作用、抗線維化作用など様々な作用があることがわかっている。これらの作用から、マウスでの急性腎障害への腎機能改善へ効果があることが報告されている。しかし、慢性腎障害への長期投与の効果は不確定なままである。<方法>腎代替療法導入の原因となる慢性腎疾患として最も患者数の多い糖尿病性腎症のモデル動物にて検討した。2型糖尿病のモデルマウスである db/db マウスに8週齢から16週齢まで8週間に渡りグレリン(300 μ g/kg/day)を連日腹腔投与し、グレリンの腎保護効果に関して検討した。また、8週齢の C57BL/6 マウスへストレプトゾトシン(STZ)を投与し1型糖尿病モデルとし、12週齢から24週齢まで12週間に渡りグレリン(300 μ g/kg/day)を連日腹腔投与し、グレリンの腎保護効果に関して検討した。<結果> db/db マウスへのグレリン投与では、グレリン非投与群とグレリン投与マウスで腎機能やアルブミン尿に差は認めなかった。1型糖尿病のモデルマウスである STZ 投与マウスへのグレリン投与では、グレリンの長期投与により糖尿病性腎症による尿アルブミン増加を抑制した。また、1型糖尿病発症により体重減少を来たすのに対し、長期のグレリン投与により摂食量を増やさず体重減少を抑制する効果があることが示された。また、糖尿病性腎症による糸球体基底膜肥厚、podocyte の癒合、尿細管ミトコンドリアの swelling がグレリン投与により抑制した。[結論]グレリンの長期投与により、1型糖尿病での糖尿病性腎症への腎保護効果が示唆された。

研究目的

グレリンとはラットとヒトの胃で発見されたペプチドホルモンで、GH 分泌促進受容体を介して GH 分泌を誘起させるホルモンである。グレリンは摂食行動の生理的信号物質であり、成長ホルモンの分泌と摂食を増進して成長を制御する。他にもグレリンには抗炎症作用、抗線維化作用など様々な作用があることが報告されている。

グレリンはグレリン受容体を介して作用し、その受容体は腎臓にも発現が認められている。グレリンの腎での作用については、マウスの虚血再還流傷害や敗血症での急性腎不全において、腎機能を保護することが報告されている。しかし、慢性腎臓病での働きについては不明な点が多い。我々は新規代謝調節ホルモンであるグレリンの慢性腎障害に対する腎保護作用について、腎代替療法導入の原因となる慢性腎障害で最も患者数の多い糖尿病性腎症のモデル動物を用いて検討を行った。

C. 研究方法

2型糖尿病のモデルマウスである db/db マウスに 8 週齢から 16 週齢まで 8 週間に渡りグレリン(300 μ g/kg/day)を連日腹腔投与した。db/db マウスの対照群として m/m マウスを使用し、また、グレリン非投与群へは生理食塩水を連日腹腔投与した。腎機能や体重について検討した。

1型糖尿病のモデルとして、8 週齢の C57BL/6 マウスへストレプトゾトシン (STZ)50mg/kg を 5 日間連続で腹腔投与した。血糖値にて糖尿病発症を確認した後、12 週齢から 24 週齢まで 12 週間に渡りグレリン (300 μ g/kg/day)を連日腹腔投与した。腎機能および体重について検討した。

C. 研究結果

2型糖尿病のモデルマウスである db/db マウスで検討を行った。16 週齢での尿検査では、尿蛋白および尿アルブミンのグレリン投与による抑制効果は認めなかった。(図 1) 血液検査での UN、Cr でもグレリン投与による差は認めなかった。(図 2) 体重は、対照群である m/m マウスではグレリン投与による差はなかったが、db/db マウスではグレリン投与により体重が増加した。(図 3) しかし、

摂食量はグレリン投与でも変わらなかった(図 4)ため、グレリン投与による代謝の変化により体重が増加したことが示唆された。

次に、1型糖尿病モデルとして STZ 投与マウスでの検討を行った。24 週齢での尿検査では尿アルブミンは STZ 投与の糖尿病発症で増加し、グレリンの長期投与でその増加が抑制された。尿蛋白でも、同様の傾向が見られた(有意差はなかった)。尿細管マーカーである NAG では、この傾向はなかった。(図 5) 血液検査では UN には STZ 投与で悪化し、グレリン長期投与により悪化が抑制される傾向にあった(有意差はなかった)。Cr には差を認めなかった。(図 6) 体重は STZ 投与による 1 型糖尿病発症により減少し、グレリンの長期投与によりその減少は抑制された。(図 7) 摂食量はグレリンの長期投与では変わらなかった。(図 8) これらにより代謝の変化によって体重減少を抑制したことが示唆された。また、糖尿病性腎症に対する腎保護効果の機序を解明すべく、24 週齢マウスの sacrifice 後の腎臓を電子顕微鏡で観察した。すると、糸球体では、STZ 投与の群では基底膜が肥厚して凹凸が見られるのに対し、グレリンの長期投与にてその変化が抑制された。また、STZ 投与の群では podocyte の open slit pore は減少し close slit pore は増加するが、これらの変化はグレリンの長期投与した群は弱い変化であった。(図 9) 尿細管細胞では、STZ 投与によりミトコンドリアが全体的に大きく swelling と呼べるような変化をきたしており、内部構造のクリステは粗雑な印象であった。(図 10)

D. 考察

消化管から主に分泌されるホルモンであるグレリンの長期投与を、腎代替療法導入の原因となる慢性腎障害で最も患者数が最も多い糖尿病性腎症のモデル動物で行い、腎機能保護の作用を検討した。

2型糖尿病モデルである db/db マウスでは腎機能保護の効果を認めなかったが、多重が増加しており、肥満の影響で糖尿病の病勢が悪化したことや、肥満性腎症の悪化を起こし、グレリン投与による腎保護効果を相殺した可能性も否定できなかった。

1型糖尿病モデルである STZ 投与マウスにおいて、尿アルブミンの増加を抑制した。

電子顕微鏡で、糸球体および尿細管にて糖尿病によると考えられる変化も抑制するという結果であった。これまで虚血再灌流や敗血症での AKI のモデル動物を用いて、グレリン投与による腎保護効果を示す報告があった。また、慢性腎障害のモデル動物や人においてもグレリン投与する研究があったが、投与期間が単回から 2 週間と短く、また評価項目が腎機能ではなく、体重や摂食量の増加であり、腎機能保護作用については差がなかったという報告や、言及されていない報告であった。今回の我々の研究で、グレリンの長期投与による安全性がモデル動物により示されたのは、グレリン投与を慢性腎障害悪化に対する新規治療戦略として確立する上で有用であったと考える。また、腎代替療法導入となる慢性腎障害で最も患者数が多いのが糖尿病性腎症である。この疾患モデルで、腎機能悪化の抑制効果を示せたことは、将来的に、グレリンを投与できる患者が多数になることにつながると考える。また、痩せを呈する STZ 投与マウスへグレリンの長期投与により、摂食量を変えないが体重は増えた。慢性腎障害をはじめ慢性疾患の多くは進行すると、Protein Energy Wasting(PEW)やカヘキシアの状態となり、体重は減少し、生命予後を短くすることが報告されている。グレリンの長期投与により、体重減少する慢性腎障害のモデル動物で体重増加を示せたことは、グレリン投与による腎機能保護だけでなく生命予後の延長にも寄与することに期待できる結果と考える。電子顕微鏡の観察では、STZ 投与した群で、糸球体では、基底膜が肥厚して凹凸が出現し、podocyte の open slit pore が減少し、close slit pore が増加したが、これらの変化をグレリンの長期投与により抑制した。この結果は、STZ 投与による尿アルブミンの増加、グレリン投与によるその抑制効果と一致する。また、STZ 投与で尿細管細胞のミトコンドリアの swelling 様の変化を認め、グレリン投与でこの変化は抑制された。ミトコンドリアの swelling は、ミトファジーやミトコンドリア生合成で生じると考えられており、急性腎障害の尿細管細胞内でもこの変化が起きていることが報告されている。我々の研究室では、糖尿病性腎症において尿細管の機能異常から糸球

体の異常を及ぼすという尿細管系球体連関の機序を報告した。この尿細管細胞ミトコンドリアの変化も、糖尿病性腎症の早期の変化と考えられ、機序の解析を進めている。

E. 結論

我々は 1 型糖尿病モデル動物にグレリンを長期投与することで、糖尿病性腎症の悪化を抑制する効果があることを示した。この研究結果よりグレリンの長期投与は糖尿病性腎症をはじめとする慢性腎障害患者に対し、腎機能悪化の抑制、生命予後の延長を期待できる新規治療戦略となりうると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

1. 特許取得

糖尿病性腎症予防治療薬特許申請準備中
発明者：伊藤 裕、脇野 修、中谷 英章、
藤村 慶子、篠塚 圭祐、寒川 賢治 出
願者：慶應義塾

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図 1

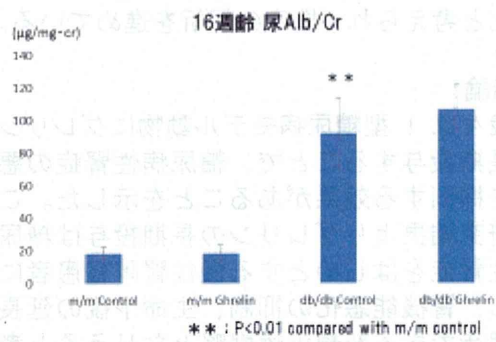


図 2

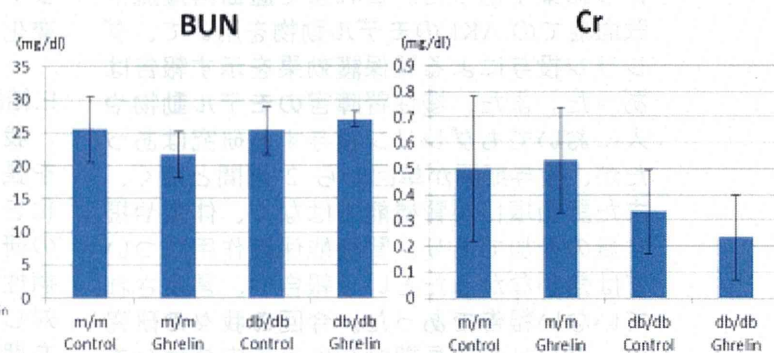


図 3

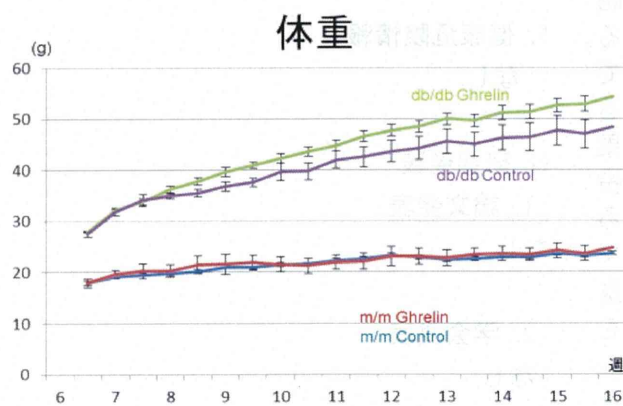


図 4

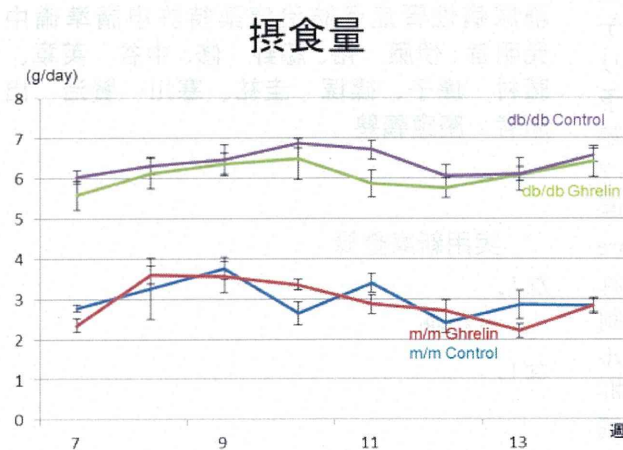


図 5

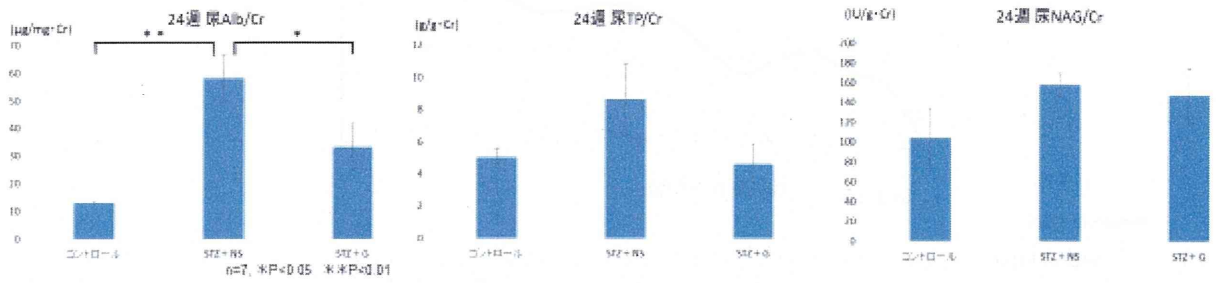


図 6

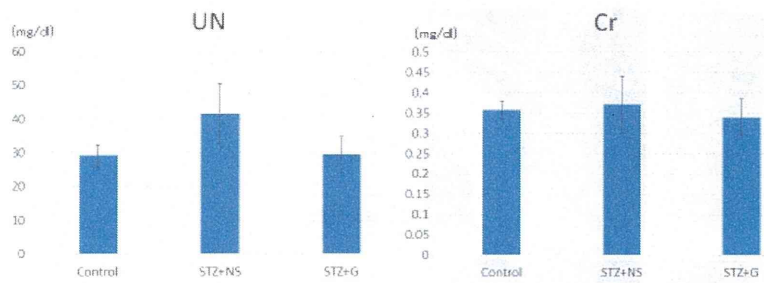


図 7

体重

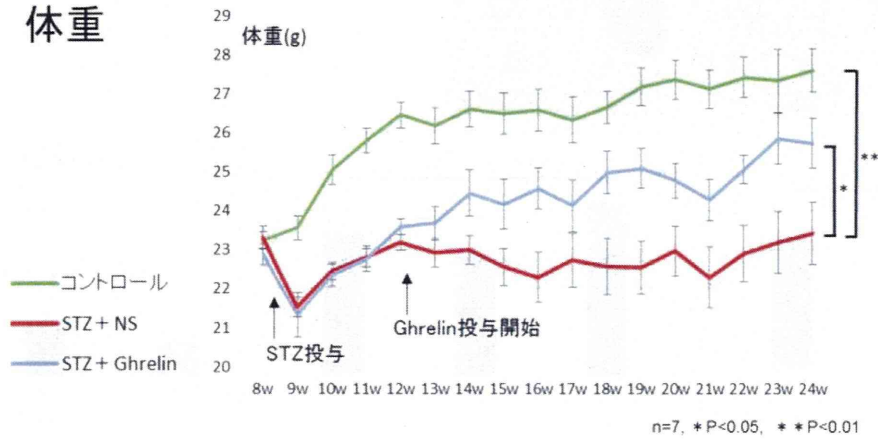


図 8

摂食量

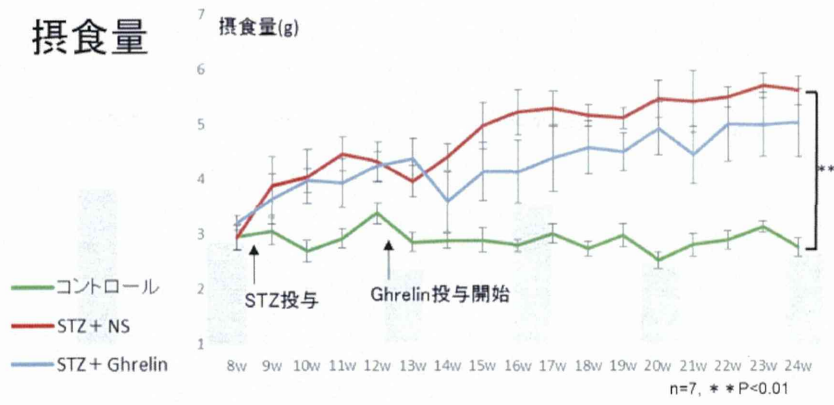


図 9

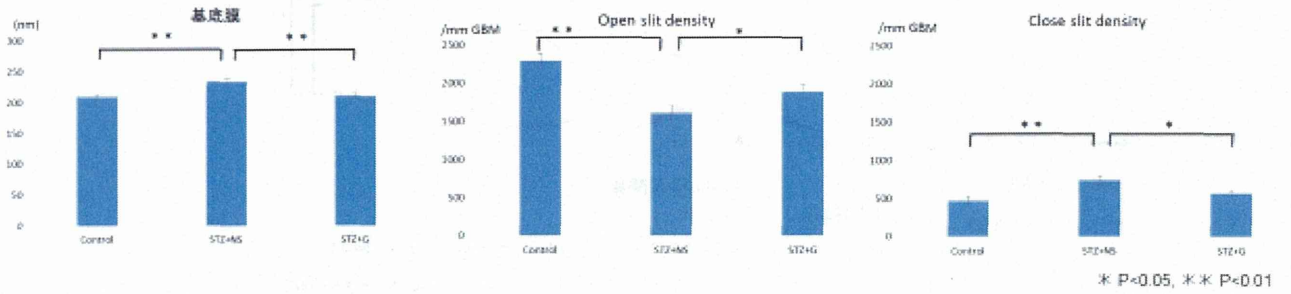
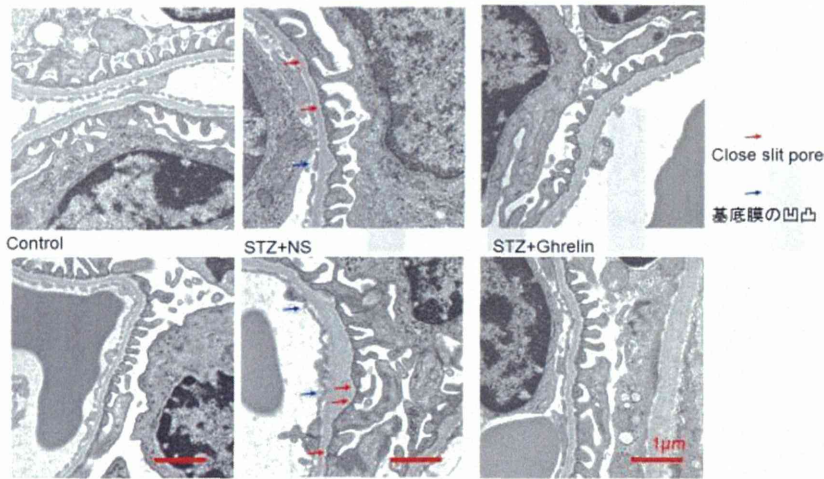


図 10